

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

**Porovnání původní Ellmanovy metody a její modifikace  
s použitím readeru mikrotitračních destiček**

**Comparison of original Ellman's method and its modification using microplate reader**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Martina Morávková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

Podpis:

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala Ing. Kateřině Macákové Ph.D., školitelce diplomové práce, za vedení práce, poskytnuté materiály, pomoc při měření v laboratoři, řešení a zpracovávání diplomové práce. Děkuji také ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí zázemí pro provedení experimentální části diplomové práce. Zvláštní dík patří členům pracovní skupiny ADINACO, kteří mi poskytli látky pro měření v této práci.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza .....</b>	<b>4</b>
3.1.1	Funkce v lidském organismu .....	4
3.1.2	Otravy organofosfáty .....	5
3.1.3	Alzheimerova choroba .....	6
3.1.4	Enzymové modely AChE a BuChE .....	7
3.1.5	Standardy využívané pro měření inhibice AChE a BuChE.....	7
<b>3.2</b>	<b>Metody stanovení inhibice cholinesteráz .....</b>	<b>11</b>
3.2.1	Ellmanova metoda .....	11
3.2.1.1	Modifikace Ellmanovy metody .....	13
3.2.2	Bioautografická metoda .....	14
3.2.3	Fluorimetrická metoda .....	14
<b>4</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál a chemikálie.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Testované látky .....</b>	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Přístroje .....</b>	<b>17</b>
<b>4.4</b>	<b>Postup měření.....</b>	<b>18</b>
4.4.1	Úprava enzymových preparátů .....	18
4.4.2	Stanovení teploty optimální pro aktivitu AChE a BuChE.....	19
4.4.3	Měření na readeru mikrotitračních destiček .....	20
4.4.4	Měření na spektrofotometru .....	21
<b>4.5</b>	<b>Statistické hodnocení .....</b>	<b>22</b>

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Abstrakt.....</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>39</b>
<b>11</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>40</b>

# 1 Úvod

Enzymy jsou biokatalyzátory, díky nimž probíhá většina chemických reakcí v organismech. Jsou velmi účinné, s jejich pomocí můžou reakce probíhat i za mírných podmínek (nízká teplota, atmosférický tlak, neutrální pH) a lze je poměrně snadno regulovat. Jejich hlavní účel je katalyzovat přeměnu substrátů za vzniku produktů. Jsou důležité pro rozklad látek, které zajišťují energii. Produkty těchto reakcí jsou využity pro tvorbu bílkovin, DNA, membrán, buněk a tkání [1, 2, 3].

Enzymy jsou charakteristické typem reakce, kterou katalyzují, substrátem, který přeměňují, a prostorovým uspořádáním substrátu. Můžeme je rozdělit do 6 skupin: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy [2].

Enzymové reakce mohou být ovlivněny pomocí teploty, pH, koncentrace enzymu a substrátu. Reakce jsou urychleny vlivem zvýšené teploty. Každý enzym má vlastní optimální pH, při kterém je jeho aktivita nejvyšší. Většinou je toto optimum umístěno do neutrální oblasti. Pokud ale dojde k nadměrnému zvýšení teploty nebo k velké změně pH, může se enzym nevratně poškodit denaturací [1, 4].

Množství substrátu může také ovlivnit rychlost reakce. Zvyšováním množství molekul enzymu vzrůstá rychlost reakce až do vytvoření rovnováhy [1].

V této práci jsou zkoumány enzymy acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE). Měření jejich inhibice je využíváno při testování otrav organofosfáty (OF) a při hledání nových látek potenciálně využitelných při léčbě Alzheimerovy choroby (AD).

Pro měření míry inhibice AChE a BuChE lze využít různých metod, jako je například metoda bioautografická, fluorimetrická či Ellmanova. Nejpoužívanější metoda k měření inhibice AChE a BuChE je Ellmanova metoda, která má řadu modifikací. Tato metoda je užívána k měření inhibice AChE a BuChE přírodními látkami izolovanými z různých rostlin i na pracovišti Katedry farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

V minulosti bylo prováděno měření na spektrofotometru, který nemá možnost temperace. Celkové množství směsi, která je fotometrována, je 1 ml a měření jednoho vzorku trvá přibližně 8 minut. Tento způsob měření je tak velmi časově náročný a

vyžaduje velké množství testované látky i dalších látek potřebných k měření. Od roku 2011 je měření prováděno na readeru mikrotitračních destiček, který umožňuje nastavení teploty. Měření na tomto přístroji je výrazně méně časově náročné a vyžaduje menší množství chemikálií. Inhibice AChE a BuChE řadou látek byla testována pouze na spektrofotometru a jejich další testování není možné z důvodů jejich malého množství. Proto je zapotřebí porovnat výsledky měření na dvou zmíněných přístrojích za různých podmínek a zjistit, zda výsledky měření na spektrofotometru jsou porovnatelné s výsledky z readeru mikrotitračních destiček. Protože má teplota vliv na průběh enzymatických reakcí, je také snaha zjistit, zda nemá vliv i na reakci s inhibitorem.

## **2 Cíl práce**

Cílem této diplomové práce je porovnání výsledků měření inhibice AChE a BuChE Ellmanovou metodou získaných ze dvou různých přístrojů – spektrofotometr a reader mikrotitračních destiček a vliv teploty na tato měření. Pro měření jsou vybrány látky (alkaloidy) již dříve testované, které vykazují různou míru inhibice – silné inhibitory (standardy eserín, galantamin, huperzin A), látky se středním inhibičním potenciálem alokryptopin a kalifornidin jodid a látka tazettin, který neinhibuje ani jeden z enzymů.



### **3 Teoretická část**

#### **3.1 Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza**

Cholinesterázy patří obecně do skupiny enzymů, které se nazývají hydrolázy. Tyto enzymy jsou schopné katalyzovat hydrolytické reakce, při kterých dochází k rozštěpení substrátu za přísunu vody [1, 5].

Inhibice AChE a BuChE je studována z různých důvodů. Jednak je inhibice těchto enzymů místem toxického účinku OF [6]. Dále je možné využít inhibitory cholinesteráz při terapii AD. Zjištěním schopnosti inhibice a její míry můžeme přispět k nalezení dalších látek, které by potenciálně mohly být využity při terapii této choroby nebo pro přípravu účinnějších analog [7].

##### **3.1.1 Funkce v lidském organismu**

AChE je jeden z nejzásadnějších enzymů pro nervovou odpověď a funkci. Můžeme ji najít v centrálním i periferním nervovém systému. Její role je v ukončení přenosu impulsů na cholinergních synapsích pomocí rychlé hydrolýzy neurotransmiterů. Nachází se v erytrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině a ve všech částech mozku. Jedná se o glykoprotein navázaný na membránu a vyskytuje se v několika molekulových formách [8].

AChE je šifrována jediným genem na lidském chromozomu 7. Tento gen kóduje různé proteinové produkty splétáním v kódovacím úseku originálu. AChE se vyskytuje v monomerní, dimerní a tetramerní globulární formě známé jako G1, G2 a G4, které obsahují jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky. G1 se vyskytuje pouze v rozpustné formě, zatímco G4 může být jak rozpustná, tak vázaná na membránu. Ve zdravém lidském mozku se většina cholinesterázové aktivity (80%) sestává z AChE a je představována G1 a G4 formami. Jejich poměr se liší v jednotlivých částech mozku. V mozku pacientů s AD je redukováno množství G4 formy vázané na membránu v některých místech o více než 90%. Hladiny G1 formy zůstávají zachovány [9].

BuChE můžeme nalézt v krevní plazmě, játrech, slinivce, střevní sliznici, hydrolyzuje butyrylcholin čtyřikrát rychleji než acetylcholin (ACh) [8]. Dříve byla pojmenována jako plazmatická cholinesteráza, protože přetrvává v plazmě po centrifugaci krve [10]. Dlouho nebyla známa její funkce. Nyní se ale její role odhaduje.

Například se usuzuje, že by mohla mít význam v lipoproteinovém metabolismu, udržování myelinu, buněčné adhezi a neurogenezi. Mohla by také mít svůj podíl jako likvidátor toxických molekul a na zpracovávání prekurzorových proteinů pro amyloid [8]. Také se zdá, že by mohla sloužit k detoxikaci některých přírodních toxinů [10]. V lidském mozku může být enzym nalezen v neuronech, gliích a v placích AD. Aktivita BuChE se v mozku zvyšuje s věkem a její množství je navýšené také během AD. Tento enzym hraje důležitou roli v metabolismu některých sloučenin. Například hydrolyzuje necholinové estery, suxamethonium, kokain a další látky. Exogenně podaná BuChE může urychlovat metabolismus kokainu a tímto způsobem může snižovat jeho toxický efekt. Proto se může BuChE využít pro léčbu závislosti a předávkování kokainem [8].

### **3.1.2 Otravy organofosfáty**

OF byly často používány jako insekticidy. Jsou ale vysoce toxické a lidé, kteří s nimi pracují, jsou vystaveni nebezpečí. OF totiž nevratně inhibují cholinesterázy a jejich toxicita může být měřena jako aktivita cholinesteráz v plazmě [11]. Vážou se kovalentně na serinová rezidua v aktivní části enzymu [12]. Jsou odvozeny od kyseliny fosforečné, fosfonové a fosfinové. Inhibice cholinesteráz vede k akumulaci ACh v synaptické štěrbině, která vyústí v nadměrnou stimulaci nikotinových a muskarinových acetylcholinových receptorů a v bránění neurostimulaci. Typické symptomy akutní intoxikace jsou: nervozita, svalová slabost, mióza, nadměrné slinění a pocení. Závažné otravy mohou způsobit respirační selhání, bezvědomí, zmatení, křeče a smrt. Látky patřící mezi OF jsou ethylparathion, malathion, methylparathion, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, phosmet, fenitrothion, dimethoát, phosalon [5].

Další látky, které mohou inhibovat cholinesterázy, jsou karbamáty. Na rozdíl od OF je inhibice cholinesteráz vratná [13]. Jsou to sloučeniny odvozené od karbamové kyseliny. Stejně jako OF byly využívány jako pesticidy, dále jako antiparasitika ve veterinární medicíně [5].

Zjištění stavu aktivity cholinesteráz je důležité jednak pro diagnózu otravy OF a jednak pro sledování účinnosti terapie otrav. Pro stanovení se využívá dobře dostupná erytrocytární AChE, u které míra inhibice dobře odpovídá závažnosti otravy [6].

### 3.1.3 Alzheimerova choroba

AD byla pojmenována po neuropatologovi Aloisi Alzheimerovi. Je to neurodegenerativní onemocnění, které nejčastěji začíná po 65. roce života [14]. Projevuje se poruchou centrálního acetylcholinergního systému. Dochází k poklesu tvorby a uvolňování ACh z presynaptických zakončení. ACh odbourávají AChE a BuChE v synaptické štěrbině [7]. Nedostatek ACh v mozku způsobuje degenerativní změny neuronů. Proto bylo zamýšleno použít látky, které by byly schopné inhibovat cholinesterázy, aby došlo ke zvýšení množství ACh dostupného pro přenos nervového signálu. Je to důležité, protože nedostatek cholinergního nervového přenosu je považován za hlavní důvod poruch paměti u pacientů [8].

Klinický obraz AD je popisován přítomností tří hlavní patologických znaků: plaky beta-amyloidu, neurofibrilární klubka, synaptická ztráta [8]. Mezi rizikové faktory pro tuto chorobu patří vyšší věk a genetická predispozice. Za další rizikové faktory jsou považovány: ženské pohlaví, úraz hlavy, nižší úroveň vzdělání, vysoký krevní tlak a hliník, ale ty ještě nebyly plně potvrzeny ve vztahu s touto nemocí [15].

V současné době není žádná kauzální terapie AD, protože není úplně poznána etiopatogeneze nemoci. Léčba obsahuje farmakoterapii, psychosocioterapii, léčení přidružených onemocnění a rehabilitace [16].

Farmakoterapie AD může zahrnovat jednak terapii kognitivních funkcí a také ostatních funkcí: změny chování, emocí, spánku a dalších. Pro terapii kognitivních funkcí se používají prekursor tvorby ACh, inhibitory cholinesteráz, agonisté muskarinových a nikotinových receptorů [7].

Mezi kognitiva patří centrální inhibitory cholinesteráz. Mají vliv hlavně na zpomalení průběhu AD. Tyto inhibitory působí buď reverzibilně nebo pseudoreverzibilně. Reverzibilní inhibitory jsou odbourávány játry a působí po dobu, kdy se vyskytují v plazmě. Pseudoreverzibilní inhibitory mají delší působení, jsou odbourávány cholinesterázami. K používaným látkám patří donepezil, rivastigmin a galantamin. Donepezil selektivně inhibuje AChE. Rivastigmin je schopen inhibovat AChE i BuChE. Galantamin inhibuje AChE a také zasahuje do nikotinových acetylcholinových receptorů. Dalšími kognitivy jsou sojové lecitiny a alfoscerat, ale u

nich klinické studie neprokázaly dostatečné působení. Ostatní látky působí prostřednictvím ovlivnění systému kyseliny gama-aminomáselné nebo blokují zpětné vychytávání ACh. Tyto látky jsou ale teprve ve stádiu klinického zkoušení [16].

#### **3.1.4 Enzymové modely AChE a BuChE**

Nejčastěji využívaným modelem AChE je enzym z lidské krve. Jedná se o suspenzi z celé krve nebo promytých lidských erytrocytů. Hemolýza není nutná, protože AChE se nachází na buněčné membráně [17].

Zdrojem AChE nemusí být jen lidská krev, ale může se získávat i z krve hovězí a krysích plic, jater, žaludku, srdce, svalů a mozku [17].

Dalším zdrojem AChE je extrakt z čerstvých tkání elektrického úhoře. Tam se vyskytuje AChE v několika molekulových formách, které jsou rozlišitelné jejich sedimentačními koeficienty. Většina z nich má sedimentační koeficienty 14-S a 18-S. Autolýza nebo léčba tkání elektrického úhoře přemění přírodní AChE na 11-S formy, které v čerstvé tkáni nejsou přítomny. Byly popsány postupy pro vyčištění přírodních i 11-S forem enzymu pomocí afinitní chromatografie. Studiemi bylo zjištěno, že se jedná o velké asymetrické struktury, přičemž 11-S forma je globulární [18]. Struktura lidské rekombinantní AChE a té, kterou můžeme získat z tkání elektrického úhoře, je velmi podobná. Ale kvůli posttranslačním modifikacím a molekulárním variantám lidské AChE nemůžou být považovány za totožné [19].

Mezi modely BuChE patří enzymy získané z lidského a z koňského séra [8, 20]. K měření se také využívá celé lidské sérum, kde však není možné v běžných laboratorních podmínkách stanovit přesné množství enzymu [21].

#### **3.1.5 Standardy využívané pro měření inhibice AChE a BuChE**

Látky používané v terapii mohou být také využity jako standardy [5]. Mezi inhibitory AChE a BuChE, které jsou využívány jako standardy při stanovení inhibiční aktivity různých látek, patří například galantamin, rivastigmin, fyzostigmin, eserin, donepezil, takrin a huperzin A (pouze AChE) [9]. Přehled těchto látek je znázorněn tabulkou 1 a obrázkem 1.

Eserin (Fyzostigmin) je indolový alkaloid, který lze získat z rostliny *Physostigma venenosum*. Je to krátce účinkující reverzibilní inhibitor AChE [22]. Je to velmi toxická a nestabilní sloučenina, která vykazuje časté nežádoucí účinky [23].

Takrin je aminoakridinová sloučenina, která je reverzibilním inhibitorem AChE s průměrně dlouhou dobou účinku [24].

Donepezil je selektivní, reverzibilní AChE inhibitor, který je schopen mírnit příznaky choroby a dále také oddalovat usazování amyloidových plaků. Používá se ke zpomalení progresu mírné až středně závažné AD. Studie také naznačily, že by donepezil mohl mít schopnost zlepšit řeč u dětí s autismem [5].

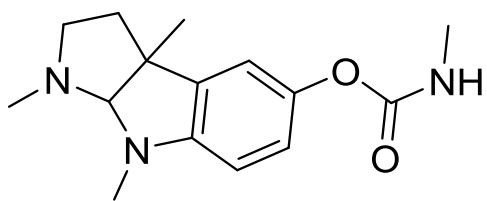
Rivastigmin je pomalý reverzibilní karbamátový inhibitor, který zamezuje cholinesterázové aktivitě navázáním na esterickou část aktivního místa. Je schopen inhibovat AChE i BuChE. Stejně jako donepezil se používá k mírnění lehké až středně těžké AD. Může být také použit při léčbě demence s Lewyho tělísky a Parkinsonově chorobě [5].

Galantamin je přírodní látka izolovaná z rostliny *Galanthus woronowii*. Je to látka, která inhibuje selektivně, kompetitivně a reverzibilně. Reaguje s anionickou stranou i s aromatickou prohlubní. Také ovlivňuje změnu nikotinových cholinergních receptorů [5].

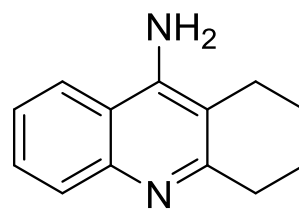
Huperzin A je alkaloid získaný z čínské plavuně *Huperzia serrata*. Jedná se o silný reverzibilní inhibitor AChE [25]. V porovnání s ostatními inhibitory vykazuje lepší prostupnost přes hematoencefalickou bariéru, větší perorální dostupnost a delší dobu inhibice AChE [5]. Také má vyšší terapeutický index. V terapeutických dávkách vykazuje minimální periferní cholinergní nežádoucí účinky. Vykazuje vyšší selektivitu a téměř žádný efekt na BuChE [26]. Využívá se v léčbě AD, schizofrenie, vaskulární demence a na zlepšování paměti u lidí v letech [5].

Sloučenina	Chemická struktura	Způsob inhibice	Využití
Donepezil	Piperidinový derivát	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc Autismus
Rivastigmin	Karbamát	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc Lewyho tělíska Parkinsonova nemoc
Galantamin	Alkaloid	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc
Takrin	Pyridinový derivát	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc
7- Metoxytakrin	Pyridinový derivát	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc
Huperzin A	Alkaloid	Reverzibilní	Alzheimerova nemoc
Fyzostigmin	Karbamát	Reverzibilní	Myastenia gravis

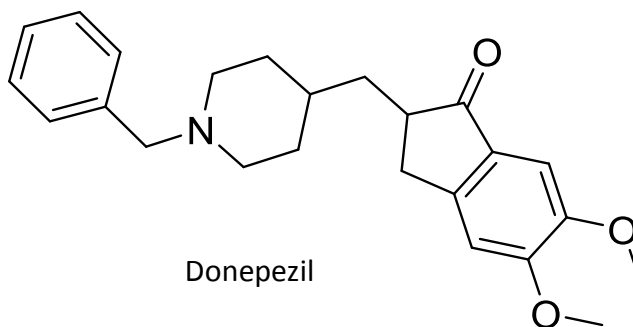
**Tabulka 1: Inhibitory AChE a jejich využití [5]**



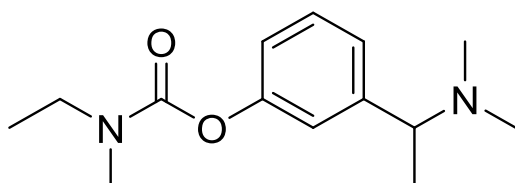
Fyzostigmin



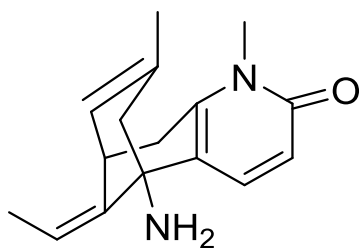
Takrin



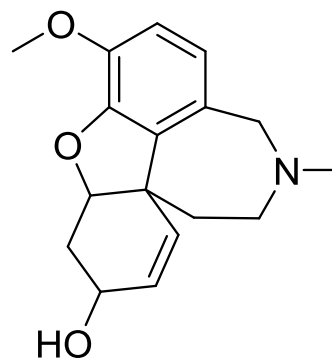
Donepezil



Rivastigmin



Huperzin A



Galantamin

Obrázek 1: Struktury vybraných inhibitorů cholinesteráz

## **3.2 Metody stanovení inhibice cholinesteráz**

### **3.2.1 Ellmanova metoda**

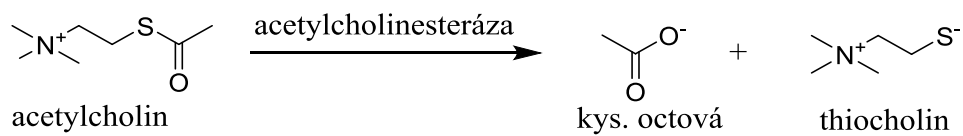
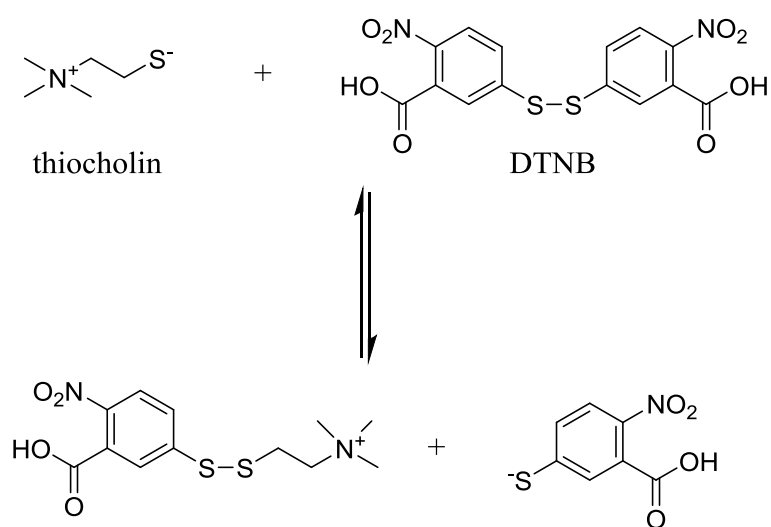
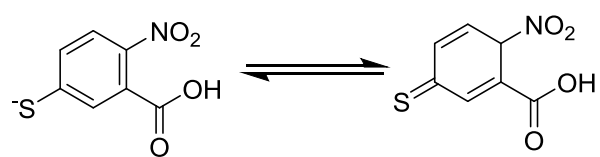
Ellmanova metoda je kolorimetrická metoda založená na hydrolýze acetylthiocholinu (ATChI) pro AChE a butyrylthiocholinu (BuTChI) pro BuChE. Touto reakcí vzniká příslušná kyselina a thiocholin. SH skupina thiocholinu je detekována pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) a uvolní se 5-merkapt-2-nitrobenový anion, který je poté stanoven spektrofotometricky [6]. Reakční schéma je znázorněno na obrázku 2.

Tato metoda je velmi rychlá, jednoduchá a levná. Mezi její nevýhody patří interference s hemoglobinem a také reakce Ellmanova činidla s pomalu reagujícími sulfhydrylovými skupinami, které mohou vést k ovlivnění výsledků měření. Pro stanovení aktivity AChE se využívá vlnové délky 436 nm, aby při reakci neinterferoval hemoglobin [6].

Při reakci je také vhodné udržovat stálé pH. Neoptimálnější pH bylo stanoveno jako 6–7, kdy je možné zanedbat samovolnou hydrolýzu [27].

Enzymová aktivita je měřena pomocí nárůstu žlutého zbarvení roztoku, které je způsobeno reakcí thiocholinu s DTNB [17].



**A****B****C**

Obrázek 2: Princip Ellmanovy metody. A: štěpení ACh na kyselinu octovou a thiocholin, B: štěpení DTNB a vznik chromoforu, C: přechod chromoforu na formu, které je fotometrována [6]

### 3.2.1.1 Modifikace Ellmanovy metody

Původní Ellmanova metoda je kolorimetrická metoda, u které je využíváno reakce thiocholinu s DTNB za vzniku žlutého zbarvení, které je stanovováno spektrofotometricky v kyvetách [6]. Kromě klasických spektrofotometrů je možné využít readery mikrotitračních destiček, kde je k měření zapotřebí menšího množství látek. Moderní readery mikrotitračních destiček také umožňují temperaci. Vzhledem k možnosti měřit více vzorků na jedné destičce je tento způsob výrazněji rychlejší než klasický spektrofotometr. Pipetováním menšího množství roztoků však může vlivem lidského faktoru docházet k větším chybám [28].

Kromě spektrofotometrického stanovení je principu Ellmanovy metody využíváno také při vyhledávání inhibitorů cholinesteráz ve směsích, které jsou děleny pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Inhibiční aktivita látek na vyvinutých TLC deskách (stacionární fáze silika gel nebo oxid hlinitý) je stanovena postřikem směsí DTNB a substrátu a následným postřikem roztokem enzymu. Výsledkem reakce je žluté zbarvení, na kterém se asi po 5 minutách objevují bílé skvrny způsobené inhibicí. Skvrny musí být zaznamenány do 15 minut, protože se během 20-30 minut vytrácí [29].

Další modifikací Ellmanovy metody je užití vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která umožňuje on-line zaznamenání inhibičního účinku sloučeniny a zároveň zjištění mechanismu účinku inhibice [30]. Tato metoda umožňuje současné oddělení a stanovení bioaktivních součástí ze souhrnných směsí. A pokud tento systém zkombinujeme s detekční diodou a hmotnostní spektrofotometrií, můžeme sloučeniny rychle určit spolu s doplňkovými informacemi. Tento způsob detekce může být využit při hledání využitelných přírodních látek [31].

### 3.2.2 Bioautografická metoda

Další možností detekce inhibice AChE a BuChE je bioautografická metoda. Tato metoda je rychlá a s její pomocí lze zjišťovat jednak aktivitu a také umístění aktivních látek v souboru rostlinných matric. Rozdělené součásti je možné přímo zaznamenat na TLC desce. Enzymová aktivita je stanovena pomocí přeměny naftylacetátu na 1-naftol, který dále reaguje s Fast blue B salt za vzniku fialově zbarveného diazoniového barviva. Oblasti TLC desky, na kterých jsou přítomny cholinesterázové inhibitory, vykazují bílé skvrny vůči fialovému pozadí [32, 33].

### 3.2.3 Fluorimetrická metoda

Fluorimetrická metoda pro stanovení inhibice AChE je založená na enzymové kaskádě, kde AChE přeměňuje ACh na cholin, který je oxidován cholinovou oxidázou. Produktem reakce je  $H_2O_2$  a ten může být stanoven reakcí s křenovou peroxidázou. Detekce se provádí fluorescencí, chemiluminiscencí, elektroanalýzou nebo pomocí nanotechnologií. Tato metoda je sice komplexní, ale také drahá a časově náročná. Proto je snaha najít nové, jednoduché a kontinuální metody [34].

Jedna z možných modifikací této metody je založena na vratném vytvoření fluorescence anionických konjugovaných polymerů. ACh nejdříve reaguje s dabcylem za tvorby kationické sloučeniny ACh-dabcyll. Poté tento komplex vytváří vazbu s anionickým polymerem poly {1,4- phenylene- [9,9- bis (4- phenoxybutylsulfonate) fluorene- 2,7- diyl]} (PFP-  $SO_3^-$ ) pomocí elektrostatických interakcí [34].

Další možností je reakce sloučeniny, která je charakteristická dvěma sulfonylovými skupinami, s myristoylcholinem tak, že vytváří emisní prvek tetrafenylethylenu. Takto vzniklý agregát silně fluoreskuje. Při této metodě je důležitá přítomnost myristoylcholinu, což je amfifilní sloučenina s jednou amoniiovou skupinou. AChE snadno hydrolyzuje myristoylcholin na myristovou kyselinu a cholin. Kvůli coulombovským odpuzivým silám mezi sloučeninou se dvěma sulfonylovými skupinami a hydrolytickým produktem myristoylcholinu může být rozložen vzniklý agregát. Důsledkem může být snížení celkové fluorescence [35].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a chemikálie

#### Chemikálie:

- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich); použit 5mM roztok; 19,82 mg/10ml
- Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich); použit 10 mM roztok ATChI; 28,92 mg/10ml
- Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich); použit 10 mM roztok BTChI; 31,72 mg/10ml
- Dimethylsulfoxid (DMSO) p. a. (Sigma-Aldrich)

#### Pufry:

- 5 mM Fosfátový pufr pH 7,4

#### Zásobní roztok A

- 10 mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nebo 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  nebo 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )

#### Zásobní roztok B

- 10 mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nebo 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  nebo 3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )

Pro přípravu pufru je smícháno 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

- 5 mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
  - 8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5 mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.
- 100 mM Fosfátový pufr

#### Zásobní roztok A

- 200 mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nebo 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  nebo 31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

#### Zásobní roztok B

- 200 mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nebo 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  nebo 71,63 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

Pro přípravu pufru je smícháno 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

#### Enzymy:

- Zdroj AChE: hemolyzát červených krvinek z lidské krve
- Zdroj BuChE: plazma z lidské krve
- Příprava hemolyzátu a plazmy z lidské krve
  - Erytrocyty se získávají z krve, která je čerstvě odebrána zdravým dobrovolníkům. Krev je centrifugována při rychlosti 4000 rpm v centrifuze Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611 při 4°C po dobu 10 minut. Poté je plazma odsáta, aby byla oddělena od erytrocytů. Erytrocyty jsou následně zředěny 5 mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného a zcentrifugovány. Erytrocyty jsou promyty

celkem třikrát. Dále je přidán 5 mM fosfátový pufr o pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby vznikl poměr erytrocyty:pufr 1:9, a směs je zhomogenizována překlápěním. Poté necháme erytrocyty spontánně hemolyzovat v Erlenmayerově baňce po 10 minut za míchání teflonovým míchadlem na magnetické míchačce při 300 rpm. Po zhemolyzování je suspenze rozplněna do mikrozkušavek PP (2 ml, Eppendorff PCR), do doby stanovení aktivity je uchovávána při teplotě -22 °C.

## 4.2 Testované látky

- Allokryptopin (izolován z *Chelidonium majus* [21])
- Kalifornidin jodid (izolován z *Eschscholtzia californica* [36])
- Eserin (Sigma-Aldrich)
- Galantamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., Čína)
- Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd. Čína)
- Tazettin (izolován z *Chlidanthus fragrans* [37])

## 4.3 Přístroje

- Spektrofotometr (Shimadzu UV-1601, Shimadzu Corporation, Japonsko)
- Reader mikrotitračních destiček (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader, BioTec Instruments, Inc., USA)
- Třepačka mikrotitračních destiček (IKA MS3 digital, IKA Labortechnik, Německo)
- Třepačka zkumavek (IKA Vortex Genius 3, IKA Labortechnik, Německo)
- Váhy (KERN ABT 120-5DM, KERN, Belgie)
- Elektronická pipeta (Eppendorf Research pro 100, Eppendorf, Německo)

#### 4.4 Postup měření

V postupu byla uplatněna Ellmanova kolorimetrická metoda modifikovaná podle Bajgara. Při této metodě jsou estery thiocholinu štěpeny příslušnými cholinesterázami na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovujeme SH- skupinu thiocholinu, která vytvoří vazbu s DTNB. Vzniká žlutě zbarvený produkt, který stanovujeme spektrofotometricky pro hemolýzát při vlnové délce 436 nm a pro plazmu při vlnové délce 412 nm. Zjišťujeme nárůst absorbance za 1 minutu.

##### 4.4.1 Úprava enzymových preparátů

Zmražený hemolýzát se vyjme z mrazničky a nechá se asi 14 hodin v chladničce při 4°C, potom se přenese na pracovní stůl a ponechá se inkubovat 45 minut při pokojové teplotě v černém papírovém obalu a po každých 15 minutách se krátce promíchá na míchačce. Poté se rychle zfiltruje přes malou zpevněnou vrstvu buničité vaty v Pasteurově pipetě za pomoci přetlaku balónkem tak, aby byl filtrát čirý (prvních 200 µl filtrátu se nepoužije). Pro analýzu se ředí podle tabulky 2.

H (hemolýzát)	1 : 0	3 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5
P (plazma)	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4		

Tabulka 2: Ředění enzymových preparátů pro stanovení jejich aktivity\*

\*poměr udává objem koncentrovaného enzymového preparátu : objemu 5 mM fosfátového pufru pH 7,4

Odměří se 50 µl hemolýzátu H nebo plazmy P, přidá se potřebné množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 k ředění a v PP zkumavce se zhomogenizuje na třepačce.

##### ➤ Pro AChE:

- vhodný takový poměr ředění 5 mM fosfátovým pufrům pH 7,4, u něhož je nárůst absorbance  $\Delta A = 0,08-0,15$
- po 9 hodinách vyjmutí z chladničky, příslušném zředění a uchovávání na pracovním stole poklesne nárůst absorbance asi o 10 %

➤ Pro BuChE:

- vhodný takový poměr ředění, u něhož je  $\Delta A = 0,15 - 0,20$

Po přípravě se preparáty uchovávají při  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Doba použitelnosti je minimálně 6 měsíců od data přípravy. Pokud se používají po této době, musí se vždy každý týden kontrolovat aktivita, v případě hemolyzátu musí být  $\Delta A = 0,08 - 0,15$  (nejlépe 0,15), v případě plazmy  $\Delta A = 0,15 - 0,20$  (nejlépe 0,20).

#### **4.4.2 Stanovení teploty optimální pro aktivitu AChE a BuChE**

Na readeru mikrotitračních destiček byla změřena aktivita obou enzymů v závislosti na teplotě. Měření probíhalo při teplotách 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39,  $41^{\circ}\text{C}$ . Postup měření aktivity enzymů byl stejný, jako měření slepého vzorku na readeru mikrotitračních destiček. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

- 8,3  $\mu\text{l}$  hemolyzátu nebo plazmy
- 283  $\mu\text{l}$  DTNB s pufrém (67  $\mu\text{l}$  DTNB a 215  $\mu\text{l}$  100 mM fosfátového pufru)
- 8,3  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (DMSO)
- 1 minutu destička třepána na třepáčce
- vložení do readeru (inkubace 5 minut při dané teplotě)
- dále přidat 33,3  $\mu\text{l}$  substrátu (ATChI nebo BuTChI)
- po 2 minutách měření nárůstu absorpance při 436 nm pro hemolyzát a 412 nm pro plazmu po dobu 1 minuty

Z naměřených hodnot (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka) byl sestrojen graf závislosti aktivity na teplotě.



#### 4.4.3 Měření na readeru mikrotitračních destiček

Na readeru mikrotitračních destiček bylo měřeno jednak při laboratorní teplotě pohybující se mezi 25,0 - 27,6°C a také při 37°C.

##### ➤ Slepý vzorek

- 8,3 µl hemolyzátu nebo plazmy
- 283 µl DTNB s puforem (67 µl DTNB a 215 µl 100 mM fosfátového pufru)
- 8,3 µl rozpouštědla (DMSO)
- 1 minutu je destička třepána na třepačce
- vložení do readeru (inkubace 5 minut při laboratorní teplotě nebo 37 °C)
- dále přidat 33,3 µl substrátu (ATChI nebo BuTChI)
- po 2 minutách měření nárůstu absorbance při 436 nm pro hemolyzát a 412 nm pro plazmu po dobu 1 minuty

##### ➤ Měření vzorku

- 8,3 µl hemolyzátu nebo plazmy
- 283 µl DTNB s puforem (67 µl DTNB a 215 µl 100 mM fosfátového pufru)
- 8,3 µl měřeného vzorku v různých koncentracích
- 1 minutu je destička třepána na třepačce
- poté vložení do readeru (inkubace 5 minut při laboratorní teplotě nebo 37 °C)
- dále přidat 33,3 µl substrátu (ATChI nebo BuTChI)
- po 2 minutách měření nárůstu absorbance při 436 nm pro hemolyzát a 412 nm pro plazmu po dobu 1 minuty

Měření je prováděno ve třech opakováních, vždy dvakrát z různých navážek. Pro výpočet použijeme průměrnou hodnotu.

#### 4.4.4 Měření na spektrofotometru

Na spektrofotometru bylo měřeno při laboratorní teplotě, která se pohybovala mezi 24,1 – 25,3°C.

##### ➤ Slepý vzorek

- 25 µl hemolyzátu nebo plazmy
- 200 µl DTNB
- 25 µl rozpouštědla
- 650 µl 100 mM fosfátového pufru pH 7,4
- inkubace 5 minut
- dále přidat 100 µl substrátu (ATChI nebo BuTChI)
- po 2 minutách měření nárůstu absorbance při 436 nm po dobu 1 minuty

##### ➤ Měření vzorku

- 25 µl hemolyzátu nebo plazmy
- 200 µl DTNB
- 25 µl vzorku
- 650 µl 100 mM fosfátového pufru pH 7,4
- inkubace 5 minut
- dále přidat 100 µl substrátu (ATChI nebo BuTChI)
- po 2 minutách měření nárůstu absorbance při 436 nm po dobu 1 minuty

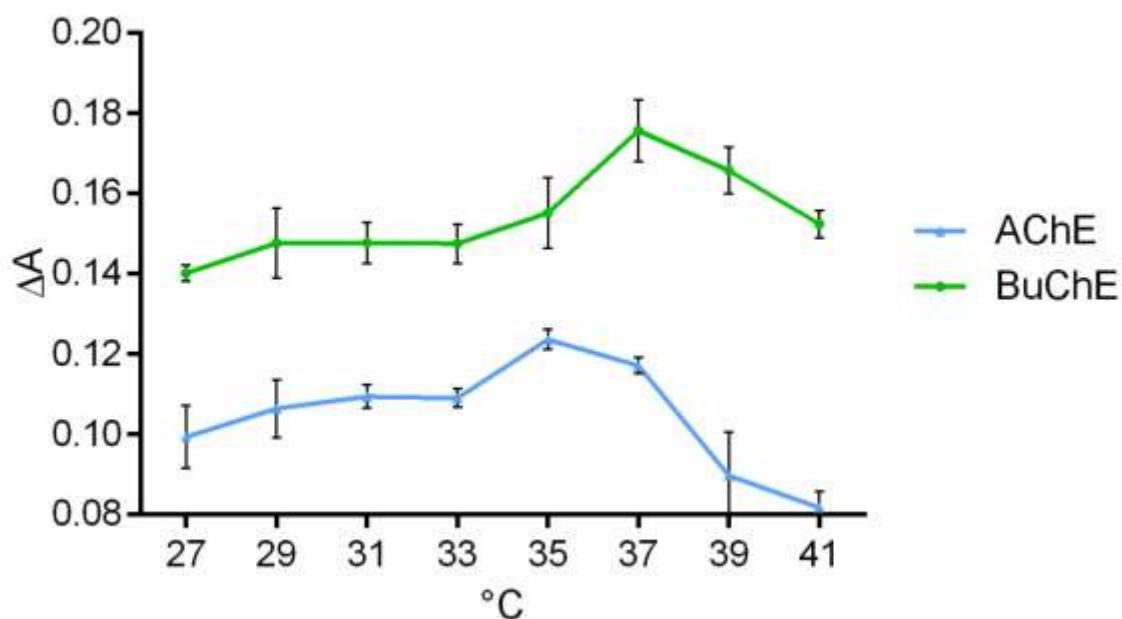
Měření je prováděno ve třech opakováních, vždy dvakrát z různých navážek. Pro výpočet použijeme průměrnou hodnotu.

## 4.5 Statistické hodnocení

Z naměřených hodnot byly pomocí statistického programu GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A) sestrojeny křivky závislosti inhibiční aktivity na koncentraci vzorku a vypočítány střední inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ). Hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé látky a enzymy byly následně podrobeny jednofaktorovému ANOVA testu s následným Bonferroniho testem mnohonásobného porovnání.

## 5 Výsledky

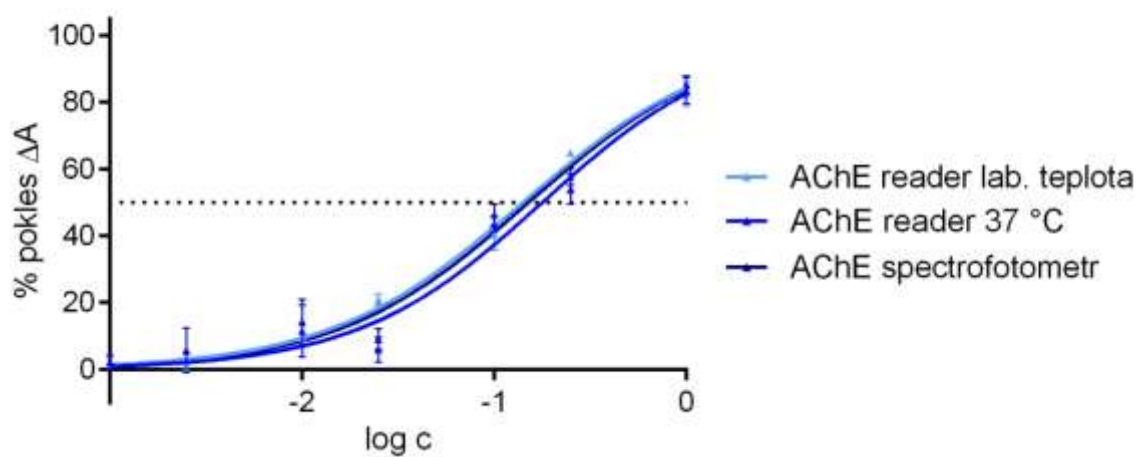
Výsledky stanovení závislosti aktivity AChE a BuChE na teplotě ukázaly, že s nárůstem teploty dochází ke zvýšení aktivity obou enzymů až do dosažení maxima a poté aktivita výrazně klesá. Maximální aktivita AChE byla naměřena při teplotě 35°C, zatímco u BuChE byla pozorována nejvyšší aktivita při teplotě 37°C (Obrázek 3).



Obrázek 3: Závislost aktivity AChE a BuChE na teplotě

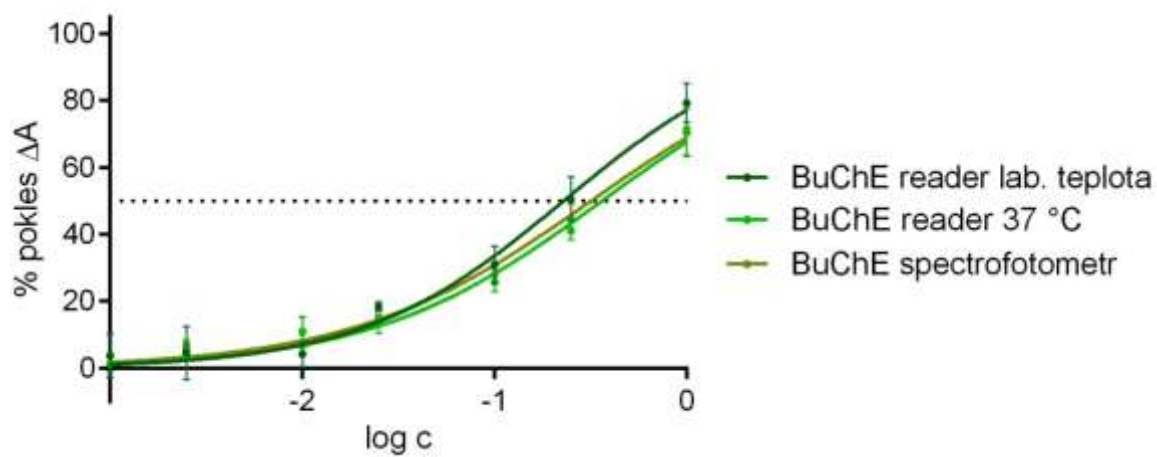
Pro jednotlivé testované látky byly sestrojeny grafy závislosti inhibiční aktivity na koncentraci, které jsou znázorněny na obrázcích 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16. Grafy pro inhibiční aktivitu tazettinu nebyly sestrojeny, protože tato látka neinhibuje ani jeden z enzymů, jak při měření na spektrofotometru, tak při měření na readeru mikrotitračních destiček. Pro huperzin A byl sestrojen pouze graf inhibiční aktivity vůči AChE, protože se jedná o selektivní inhibitor AChE, a proto BuChE neinhibuje. Pro statistické porovnání měření na různých přístrojích (spektrofotometr, reader mikrotitračních destiček) a za různých podmínek (laboratorní teplota, teplota 37°C) byly sestrojeny grafy středních inhibičních koncentrací pro jednotlivé látky a enzymy (Obrázek 6, 9, 12, 15, 17). Statisticky významné rozdíly jsou znázorněny v grafech.

### ALLOKRYPTOPIN

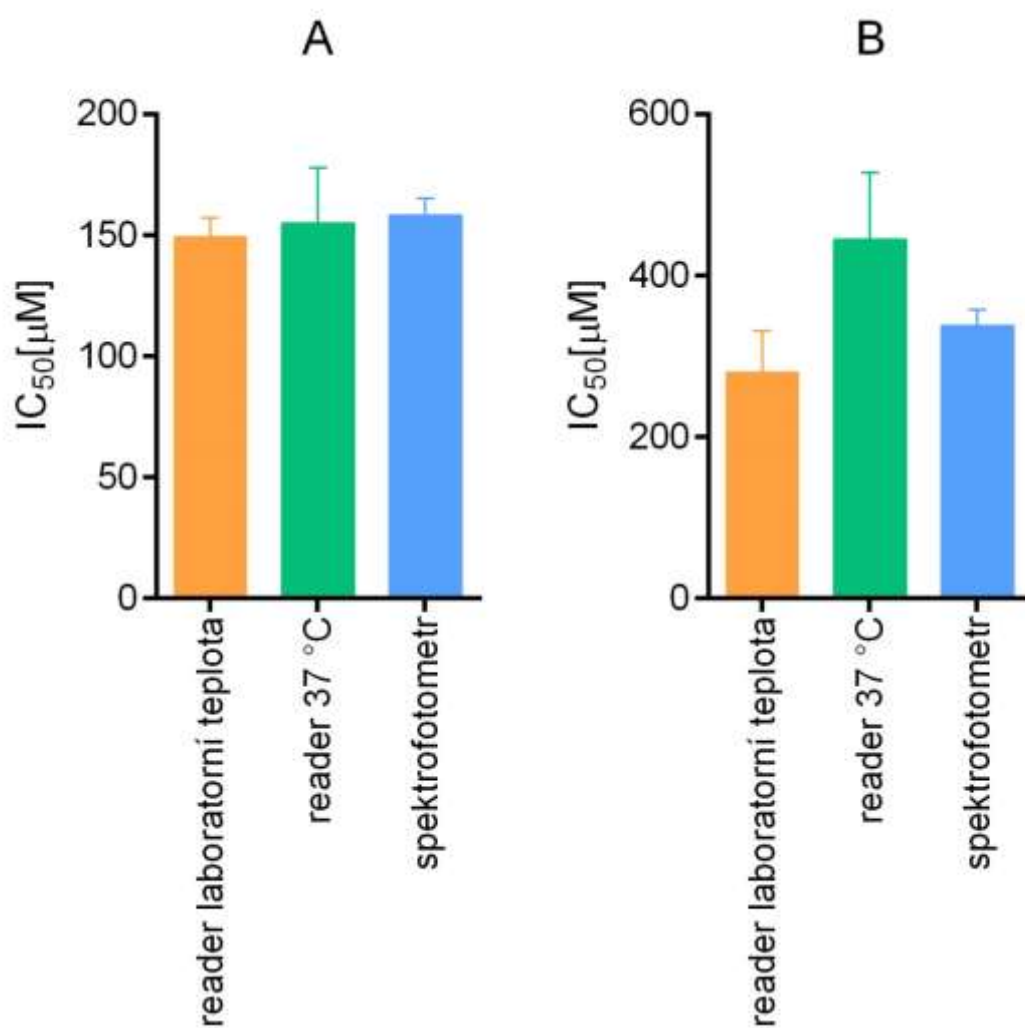


Obrázek 4: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – allokryptopin a AChE

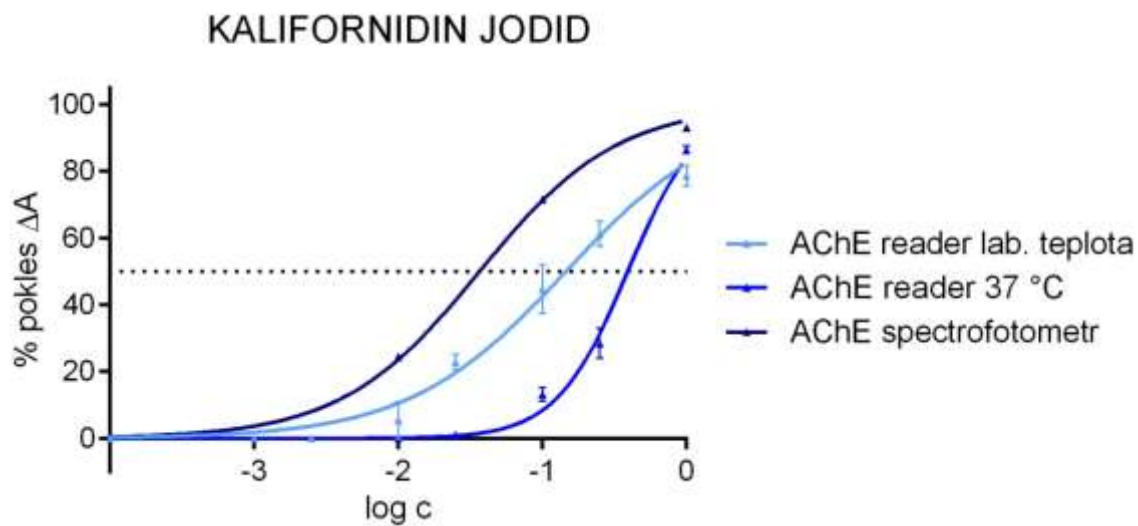
### ALLOKRYPTOPIN



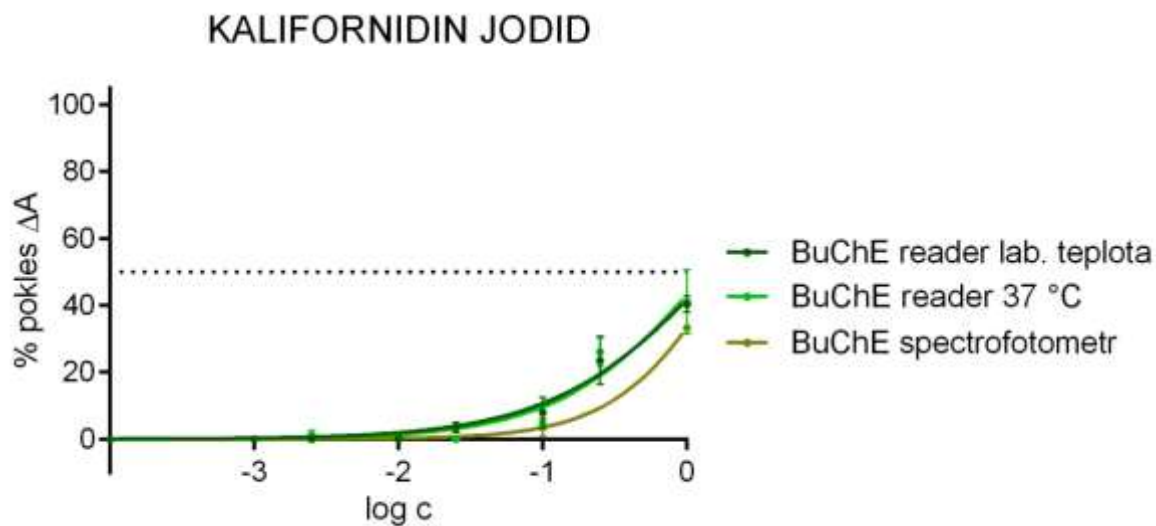
Obrázek 5: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – allokryptopin a BuChE



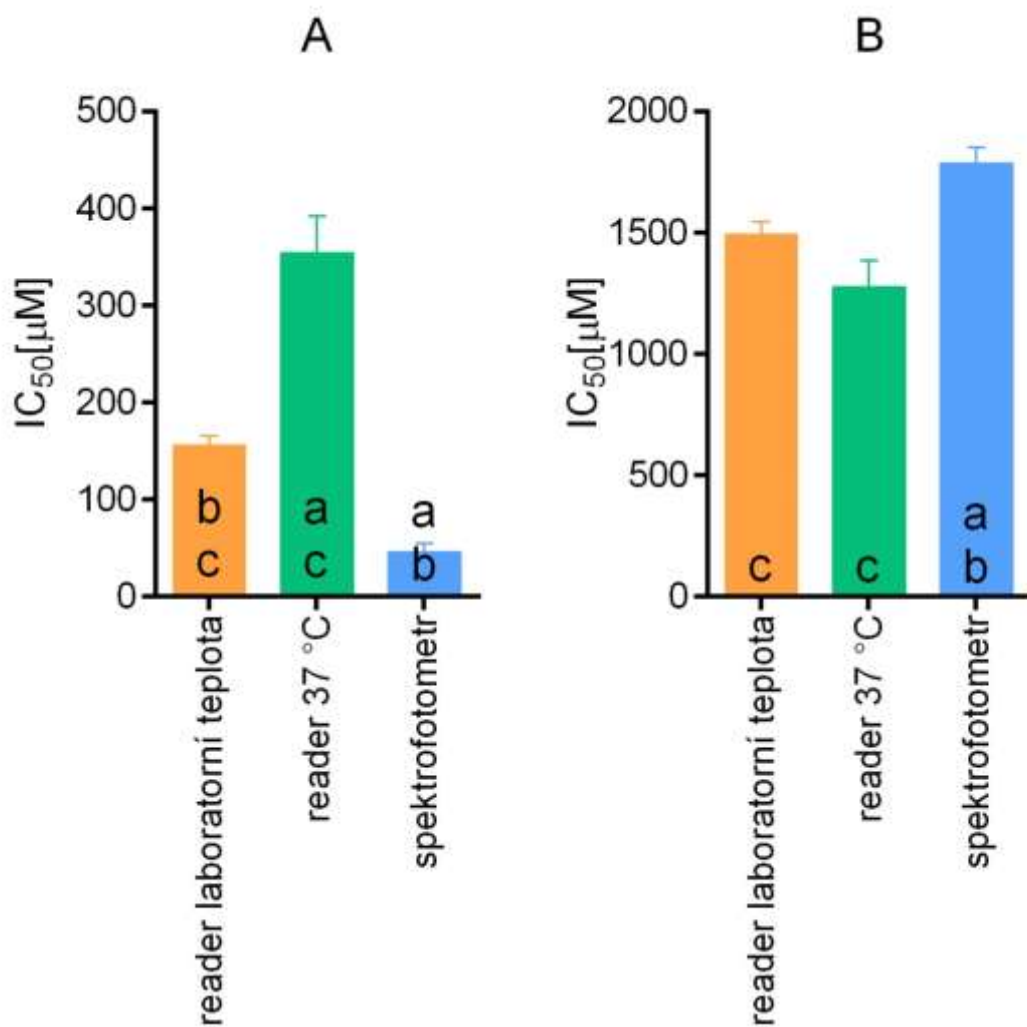
Obrázek 6: Porovnání středních inhibičních koncentrací stanovených na readeru mikrotitračních destiček a spektrofotometru pro allokrýptopín: A – AChE, B – BuChE



Obrázek 7: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – kalifornidin jodid a AChE

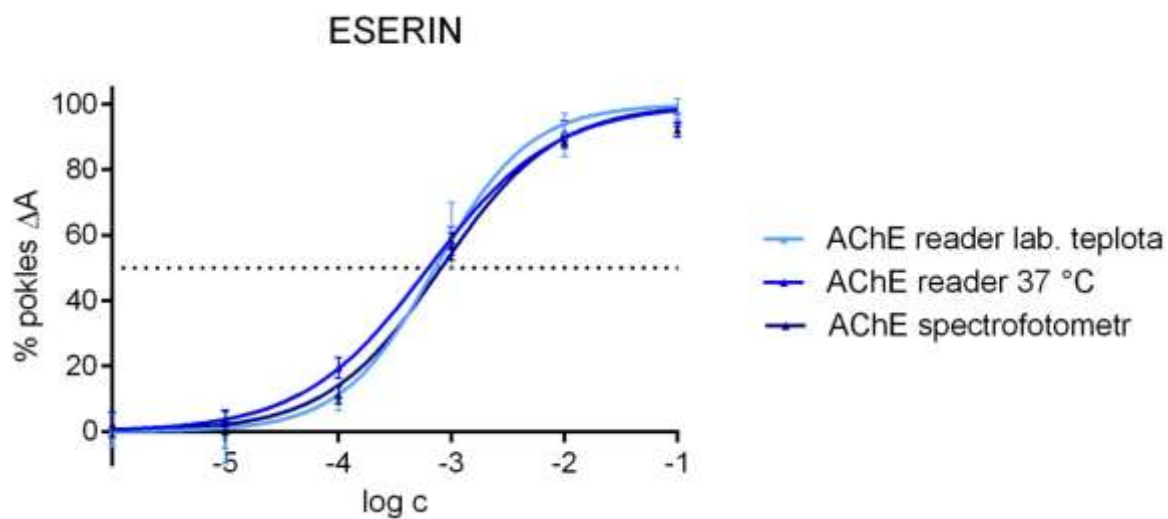


Obrázek 8: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – kalifornidin jodid a BuChE

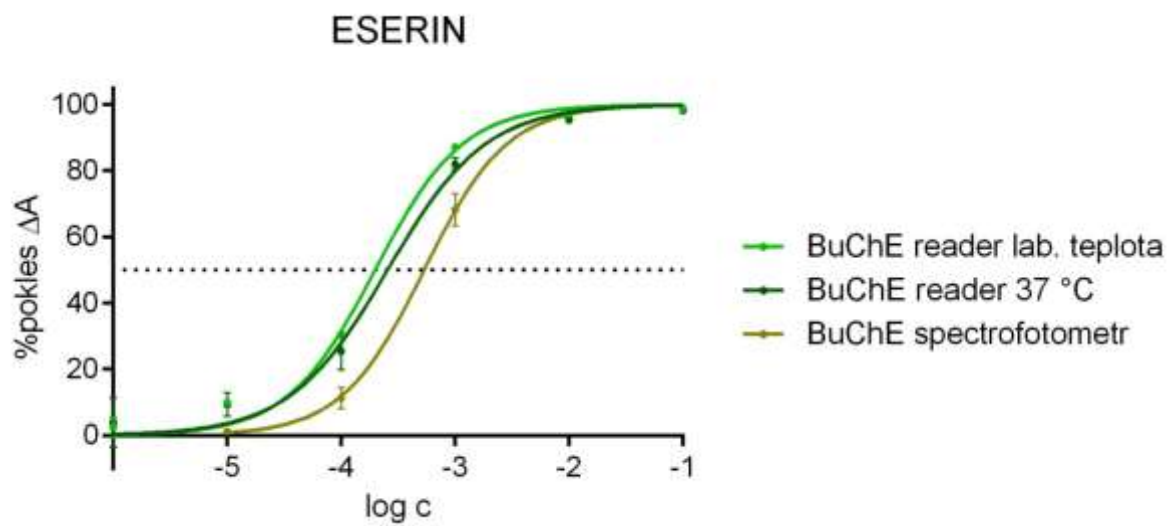


Obrázek 9: Porovnání středních inhibičních koncentrací stanovených na readeru mikrotitračních destiček a spektrofotometru pro kalifornidin jodid; statisticky významný rozdíl při  $p \leq 0,05$ ; A – AChE, B – BuChE: a - vs. reader laboratorní teplota, b - vs. reader 37 °C, c - vs. spektrofotometr

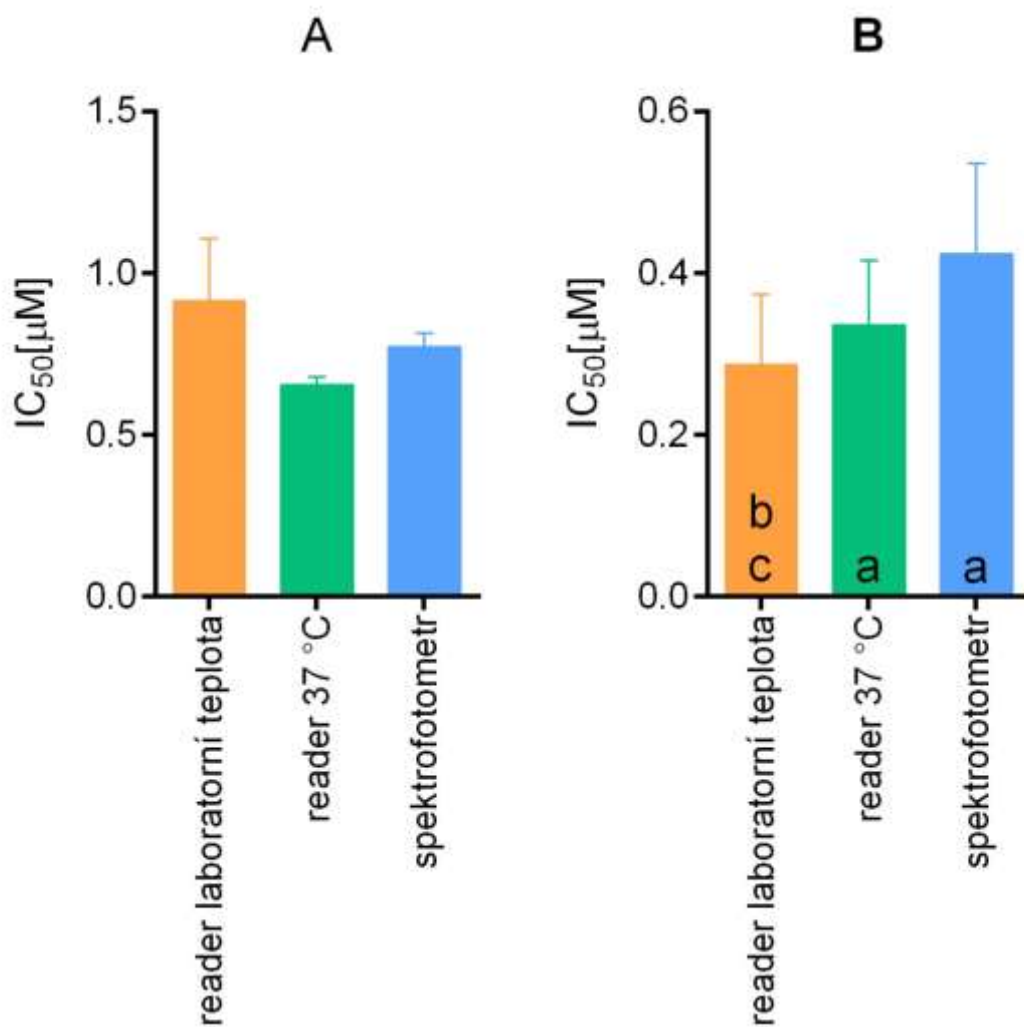




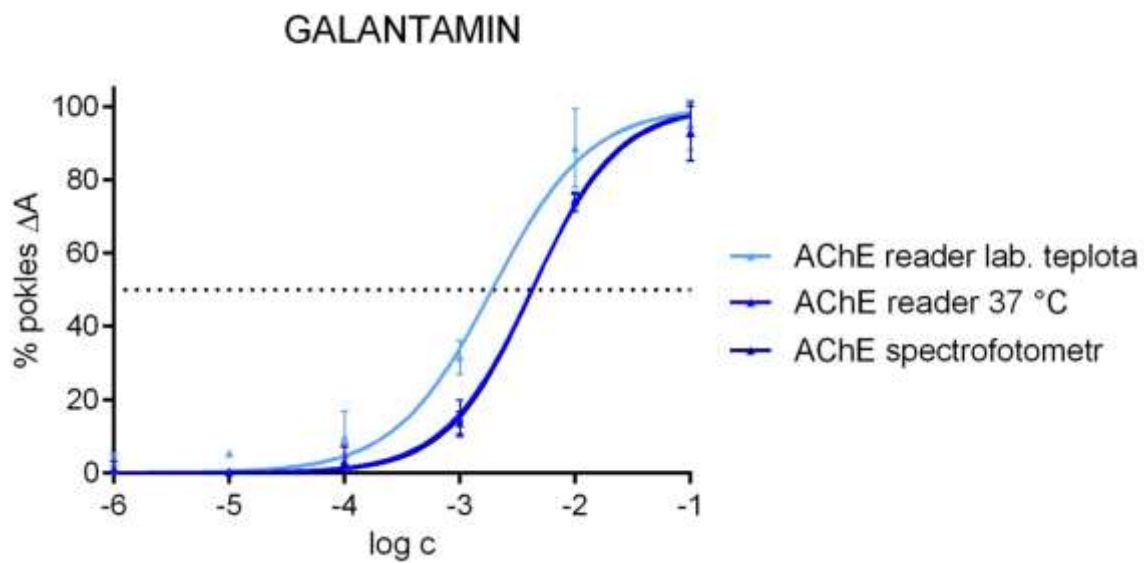
Obrázek 10: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – eserin a AChE



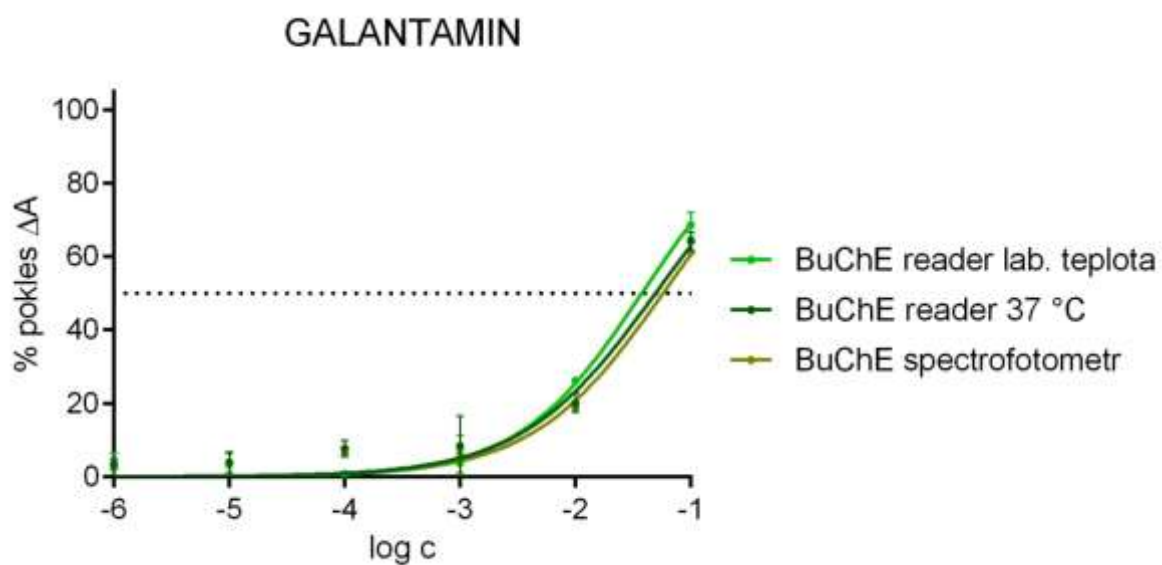
Obrázek 11: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – eserin a BuChE



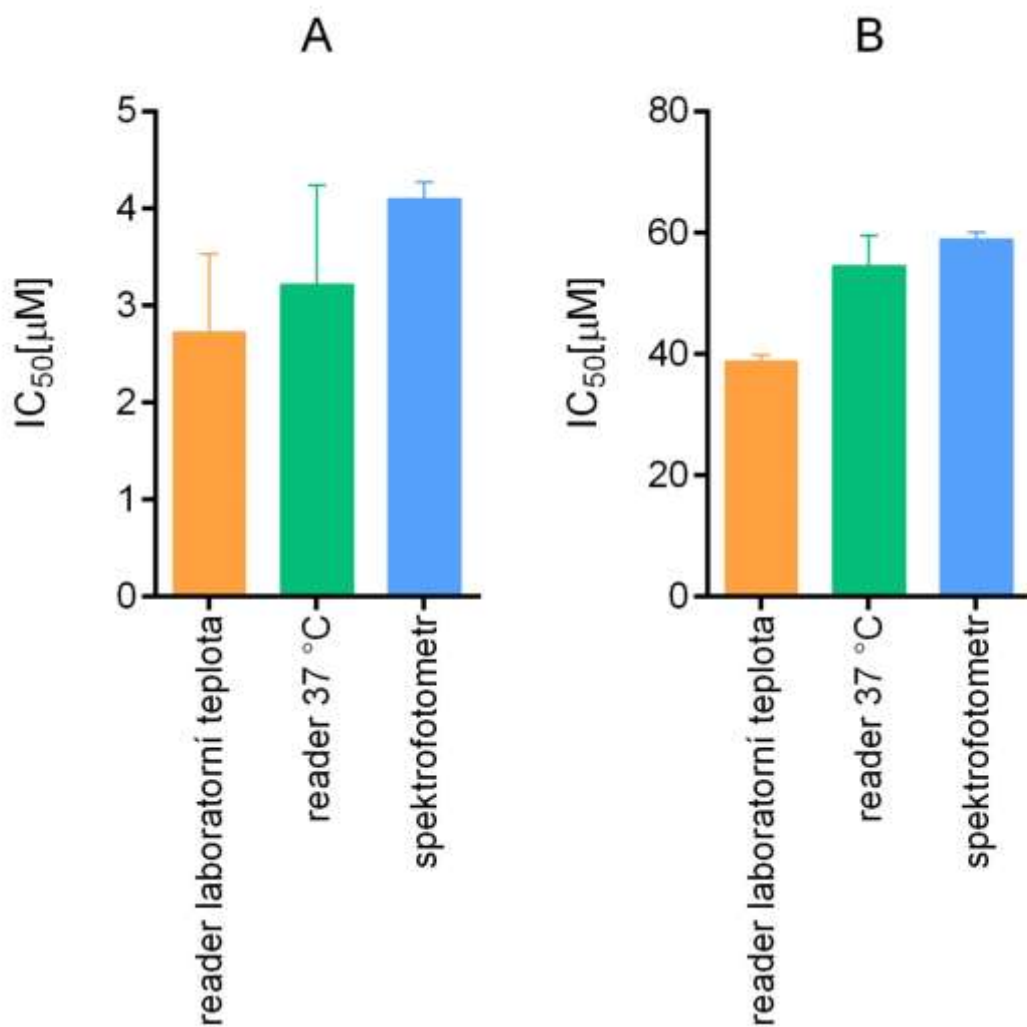
Obrázek 12: Porovnání středních inhibičních koncentrací stanovených na readeru mikrotitračních destiček a spektrofotometru pro eserín; statisticky významný rozdíl při  $p \leq 0,05$ ; A – AChE, B – BuChE: a - vs. reader laboratorní teplota, b - vs. reader 37 °C, c - vs. spektrofotometr



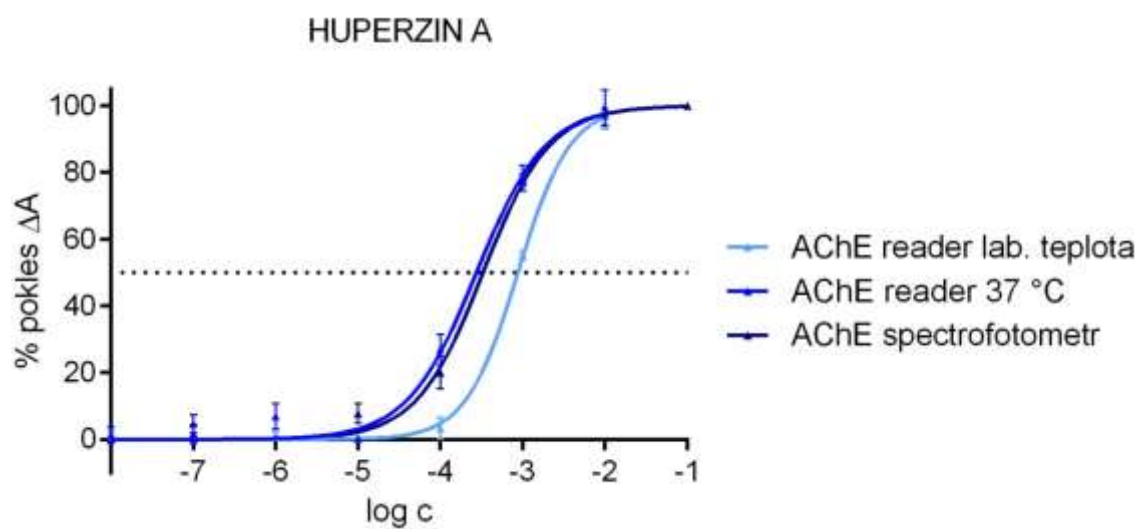
Obrázek 13: Závislosti inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – galantamin a AChE



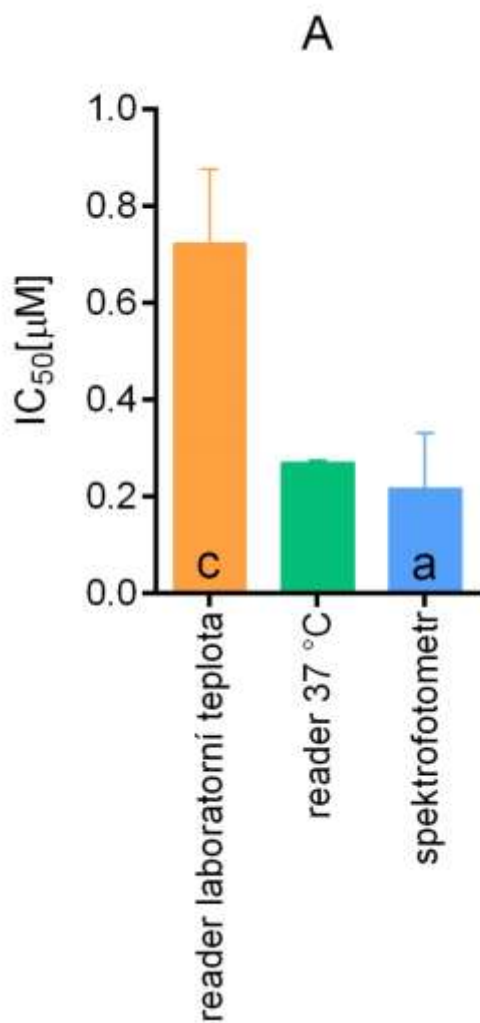
Obrázek 14: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – galantamin a BuChE



Obrázek 15: Porovnání středních inhibičních koncentrací stanovených na readeru mikrotitračních destiček a spektrofotometru pro galantamin: A – AChE, B – BuChE



Obrázek 16: Závislost inhibiční aktivity na koncentraci testované látky – huperzin A a AChE



Obrázek 17: Porovnání středních inhibičních koncentrací stanovených na readeru mikrotitračních destiček a spektrofotometru pro huperzin A; statisticky významný rozdíl při  $p \leq 0,05$ ; A – AChE: a - vs. reader laboratorní teplota, c - vs. spektrofotometr

## 6 Diskuze

Rychlost enzymatických reakcí je, kromě dalších faktorů, výrazně závislá na teplotě. Se zvyšující se teplotou dochází ke zvyšování aktivity enzymu až po dosažení jeho teplotního optima a poté se aktivita výrazně snižuje, až dochází k denaturaci enzymu a tím jeho úplné deaktivaci [1]. Pro měření AChE a BuChE inhibiční aktivity na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, je standardně používána teplota 37 °C [37]. Tato teplota byla zvolena proto, že je považována za teplotní optimum. V této práci jsme ověřily, že se jedná o teplotní optimum, kdy je aktivita enzymu nejvyšší, pro BuChE, ale nikoliv pro AChE, kde byla aktivita nejvyšší při teplotě 35 °C (obrázek 3). Rozdíl aktivity při 35 a 37 °C však nebyl statisticky významný, a proto je možné používat teplotu 37 °C pro měření inhibiční aktivity látek obou enzymů.

Při porovnání výsledků inhibice AChE a BuChE byla stanovena hladina významnosti 0,05 (5%). To znamená, že statisticky významný rozdíl je při  $p \leq 0,05$ . Z toho vyplývá, že pokud je hodnota menší nebo rovna hladině významnosti, výsledky měření není možné porovnávat. Pokud je tato hodnota vyšší, výsledky porovnat lze.

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné porovnat výsledky z dřívějších měření na spektrofotometru s měřením na readeru mikrotitračních destiček při 37°C, které se provádí v současné době.

U některých testovaných látek (allokryptopin, galantamin) nebyly při měření zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly. Při porovnávání výsledků měření na spektrofotometru a readeru mikrotitračních destiček za laboratorní teploty byly statisticky významné rozdíly u kalifornidin jodidu (AChE i BuChE), eserinu (BuChE) a huperzinu A (AChE). Z tohoto porovnání je zřejmé, že i samotný přístroj bez změny podmínek může mít vliv na výsledky měření. Z grafů, které znázorňují střední inhibiční koncentrace, je zřejmé, že větší množství pipetovaných látek (měření na spektrofotometru) vede obvykle k přesnějšímu měření (směrodatná odchylka je nižší, než u readeru mikrotitračních destiček), což může mít také vliv na výsledky měření (obrázek 6, 15).

Výsledky měření na readeru mikrotitračních destiček za laboratorní teploty a při 37 °C ukazují, že teplota může mít vliv nejen na aktivitu enzymu, ale také může ovlivňovat jeho inhibici. V obou případech, kdy se tento jev vyskytl (kalifornidin jodid AChE a eserín BuChE), byla aktivita stanovená za laboratorní teploty vyšší než při 37 °C. U ostatních látek nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly.

Pro měření na spektrofotometru byla používána jednotná vlnová délka pro oba enzymy 436 nm, při které však nedosahuje absorpce stanovovaného produktu reakce maxima. Tato vlnová délka byla zvolena tak, aby nedocházelo k interferenci s hemoglobinem, jehož spektrum a spektrum všech jeho derivátů dosahuje výrazného maxima při vlnových délkách 400-430 nm [38]. Později byly při měření inhibiční aktivity různých látek na readeru mikrotitračních destiček zvoleny dvě různé vlnové délky pro jednotlivé enzymy (436 nm pro AChE a 412 nm pro BuChE). BuChE je součástí plazmy, která neobsahuje hemoglobin, a proto zde nedochází ke zmíněné interferenci. Tato vlnová délka tak lépe odpovídá absorpčnímu maximu stanovovaného produktu. Statistické rozdíly ve výsledcích měření na spektrofotometru a readeru mikrotitračních destiček by mohly být v případě BuChE tedy způsobeny i rozdílnou vlnovou délkou zvolenou pro stanovení výsledného produktu.

Vzhledem k tomu, že u některých látek byly statisticky významné rozdíly při měření na spektrofotometru a readeru mikrotitračních destiček, nelze výsledky získané pouze z měření na spektrofotometru porovnávat s měřeními na readeru mikrotitračních destiček, které jsou prováděny v současnosti.



## 7 Závěr

V této práci byly porovnávány výsledky měření inhibice cholinesteráz (AChE a BuChE) pomocí Ellmanovy metody získané ze dvou různých přístrojů. Stanovení probíhalo na spektrofotometru při laboratorní teplotě a na readeru mikrotitračních destiček při teplotě 37°C a při laboratorní teplotě. Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy závislosti inhibiční aktivity na koncentraci vzorku a byly vypočítány střední inhibiční koncentrace. Záměrem bylo zjistit, zda jsou výsledky ze spektrofotometru porovnatelné s výsledky z readeru mikrotitračních destiček. Obecně lze shrnout, že výsledky nelze porovnávat (např. při analýze vztahu mezi strukturou a aktivitou), protože se u některých látek vyskytly při jednotlivých měřeních statisticky významné rozdíly. Tyto rozdíly mohou být způsobeny různými faktory. V této práci bylo kromě měření na dvou různých přístrojích provedeno i porovnání měření na readeru mikrotitračních destiček při různých teplotách (laboratorní teplota a teplota 37 °C). Teplota měla vliv na inhibiční aktivitu u kalifornidin jodidu (AChE) a eserinu (BuChE). U ostatních látek nebyly při těchto dvou různých teplotách zaznamenány statisticky významné rozdíly. Dalším faktorem, který je možné porovnat, je použití různých vlnových délek pro měření inhibice BuChE (spektrofotometr 436 nm, reader mikrotitračních destiček 412 nm). Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány opět u kalifornidin jodidu a eserinu.

## 8 Abstrakt

Morávková, Martina. Porovnání původní Ellmanovy metody a její modifikace s použitím readeru mikrotitračních destiček. Diplomová práce 2015. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie. Vedoucí práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Klíčová slova: Ellmanova metoda, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, spektrofotometr, reader mikrotitračních destiček.

Ellmanova metoda je často využívaným postupem při měření inhibice cholinesteráz acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE). Princip je založený na hydrolýze acetylthiocholinu a butyrylthiocholinu cholinesterázami za vzniku příslušné kyseliny a thiocholinu. Množství thiocholinu je stanoveno spektrofotometricky pomocí reakce s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou. V této práci byly porovnány výsledky měření ze dvou různých přístrojů (spektrofotometr a reader mikrotitračních destiček) a při různých teplotách (laboratorní teplota a teplota 37 °C). Pro porovnání byly zvoleny látky s různou mírou inhibice obou enzymů: allokryptopin, kalifornidin jodid, eserín, galantamin, huperzin A a tazettin. U kalifornidin jodidu (AChE, BuChE), eserínu (BuChE) a huperzinu A (AChE) byly zaznamenány statisticky významné rozdíly při měření na různých přístrojích a za různých podmínek. Obecně lze tedy shrnout, že výsledky získané dříve z měření na spektrofotometru nelze porovnávat s výsledky měření na readeru mikrotitračních destiček, které je prováděno v současnosti.

## 9 Abstract

Morávková, Martina. Comparison of original Ellman's method and its modification using microplate reader. Diploma thesis 2015. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology. Supervisor: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Key words: Ellman's method, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, spectrophotometer, microplate reader.

Ellman's method is often used procedure for measuring an inhibition of cholinesterases acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). The principle is based on hydrolysis of acetylthiocholiniodide and butyrylthiocholiniodide to give an appropriate acid and thiocholine. Amount of thiocholine is determined spectrophotometrically by reaction with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Results of measurement from two different devices (spectrophotometer and microplate reader) and at two different temperatures (room temperature and 37 °C) were compared in this thesis. Substances with different amount of inhibition of both enzymes were chosen: allocryptopine, californidine iodide, eserine, galanthamine, huperzine A and tazettine. For californidine iodide (AChE, BuChE), eserine (BuChE) and huperzine A (AChE) were detected statistically significant differences during measurement on different devices and at different conditions. In general we can summarize that the results obtained previously from the measurement on spectrophotometer cannot be compared with the results from microplate reader which is used recently.

## **10 Seznam použitých zkratk**

ACh - acetylcholin

AChE – acetylcholinesteráza

AD – Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba

ATChI – acetylthiocholin jodid

BTChI – butyrylthiocholin jodid

BuChE – butyrylcholinesteráza

DMSO – dimethylsulfoxid

DTNB – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

OF – organofosfáty

TLC – thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie

## 11 Použitá literatura

1. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. (2009) Biochemie pro studující medicíny 1. díl. Karolinum, Praha, CZ, ISBN: 978-80-246-1416-8, 548 pp.
2. FRY, M. (2010) Essential biochemistry for medicine. Wiley - Blackwell, Chichester, UK, ISBN: 978-0-470-74328-7, 308 pp.
3. MURRAY, R. K., BENDER, D. A., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., RODWELL, V. W., WEIL, P. A. (2009) Harper's illustrated biochemistry. McGraw - Hill Medical, New York, USA, ISBN: 978-0-07-162591-3, 693 pp.
4. NELSON, D. L., COX, M. M. (2004) Lehninger principles of biochemistry. W. H. Freeman, New York, USA, ISBN: 978-0716743392, 1100 pp.
5. ČOLOVIĆ, M. B., KRSTIĆ, D. Z., LAZAREVIĆ - PAŠTI, T. D., BONDŽIĆ, A. M., VASIĆ, V. M. (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11, 315-335.
6. ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J., KUČA, K., JUN, D., BAJGAR, J. (2010) Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteráz při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů. *Chemické listy*, 104, 46-50.
7. JIRÁK, R. (2004) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 18, 212-214.
8. PATOČKA, J., KUČA, K., JUN, D. (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta medica*, 47 (4), 215-228.
9. LANE, R. M., KIVIPELTO, M., GREIG, N. H. (2004) Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimers disease. *Clinical Neuropharmacology*, 27 (3), 141-149.
10. POHANKA, M., VLČEK, V., ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J., KUČA, K., CABAL, J. (2010) Kolorimetrické detektory založené na acetylcholinesterase a jejich konstrukce. *Vojenské zdravotnické listy*, 79 (1), 9-14.
11. GEORGE, P. M., ABERNETHY, M. H. (1983) Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clinical Chemistry*, 29 (2), 365-368.
12. FORSBERG, Å., PUU, G. (1984) Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. *European Journal of Biochemistry*, 140, 153-156.

13. ISTAMBOULIE, G., ANDREESCU, S., MARTY, J. L., NOGUER, T. (2007) Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (4), 506-512.
14. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. (1999) Diagnostika a léčení syndromu demence. Grada, Praha, CZ, ISBN: 80-7169-716-8, 156 pp.
15. JIRÁK, R., KOUKOLÍK, F. (2004) Demence: Neurobiologie, klinický obraz, terapie. Galén, Praha, CZ, ISBN: 80-7262-268-4, 335 pp.
16. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. (1998) Alzheimerova nemoc a další demence. Grada, Praha, CZ, ISBN: 80-7169-615-3, 229 pp.
17. ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
18. GURARI, D., SILMAN, I., FOCHS, S. (1974) Immunochemical and enzymic properties of the electric eel acetylcholinesterase - antiacetylcholinesterase system. *European Journal of Biochemistry*, 43, 179-187.
19. VASÄNGE, M. (2014) Assay suitability for natural product screening: Searching for leads to fight Alzheimer's disease. *Planta medica*, 80, 1200-1209.
20. AUGUSTINSSON, K. B., TAMES, B., MANNERVIK, B. (1974) A steady - state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma. *Biochemical Journal*, 141, 825-834.
21. CAHLÍKOVÁ, L., OPLETAL, L., KURFÜRST, M., MACÁKOVÁ, K., KULHÁNKOVÁ, A. (2010) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural Product Communications*, 5 (11), 1751-1754.
22. MUKHERJEE, P. K., KUMAR, V., MAL, M., HOUGHTON, P. J. (2007) Acetylcholine inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14, 289-300.
23. BRUFANI, M., MARTA, M., POMPONI, M. (1986) Anticholinesterase activity of a new carbamate, heptylphysostigmine, in view of its use in patients with Alzheimer - type dementia. *European Journal of Biochemistry*, 157, 115-120.

24. SUGIMOTO, H., YAMANISH, Y., IIMURA, Y., KAWAKAMI, Y. (2000) Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 7 (3), 303-339.
25. RACCHI, M., MAZZUCHELLI, M., PORRELLO, E., LANNI, C., GOVONI, S. (2004) Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, 50 (4), 441-451.
26. FILHO, J. M. B., MEDERIOS, K. C. P., DINIZ, F. M., BATISTA, L. M., ATHAYDE-FILHO, P. F., SILVA, M. S., DA-CUNHA, E. V. L., ALMEIDA, J. R. G., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brasílian Journal of Pharmacognosy*, 16 (2), 258-285.
27. BAJGAR, J. (1972) Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotní listy*, 2, 78-80.
28. DI GIOVANNI, S., BORLOZ, A., URBAIN, A., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K., CARRUPT, P., REIST, M. (2008) In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33, 109-119.
29. RHEE, I. K., VAN RIJN, R. M., VERPOORTE, R. (2003) Qualitative determination of false - positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14, 127-131.
30. ANDRISANO, V., BARTOLINI, M., GOTTI, R., CAVRINI, V., FELIX, G. (2001) Determination of inhibitor's potency (IC<sub>50</sub>) by a direct high - performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *Journal of Chromatography B*, 753, 375-383.
31. INGGANINAN, K., DE BEST, C. M., VAN DER HEIJDEN, HOFTE, A. J. P., KARABATAK, B., IRTH, H., TJADEN, U. R., VAN DER GREEF, J., VERPOORTE, R. (2000) High- performance liquid chromatography with on - line coupled UV mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A*, 872, 61-73.
32. YANG, Z., ZHANG, X., DUAN, D., SONG, Z., YANG, M., LI, S. (2009) Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *Journal of Separation Sciences*, 32, 3257-3259.

33. MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMAN, K. (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13, 51-54.
34. FENG, F., TANG, Y., WANG, S., LI, Y., ZHU, D. (2007) Continuous fluorometric assays for acetylcholinesterase activity and inhibition with conjugated polyelectrolytes. *Angewandte Chemie*, 119 (41), 8028-2032.
35. PENG, L., ZHANG, G., ZHANG, D., XIANG, J., ZHAO, R., WANG, Y., ZHU, D. (2009) A fluorescence "turn - on" ensemble for acetylcholinesterase activity assay and inhibitor screening. *Organic Letters*, 11 (17), 4014-4017.
36. CAHLÍKOVÁ, L., MACÁKOVÁ, K., KUNEŠ, J., KURFŮRST, M., OPLETAL, L., CVAČKA, J., CHEBEK, J., BLUNDEN, G. (2010) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Natural Product Communications*, 5 (7), 1035-1038.
37. CAHLÍKOVÁ, L., HRABINOVÁ, M., KULHÁNKOVÁ, A., BENEŠOVÁ, N., CHLEBEK, J., JUN, D., NOVÁK, Z., MACÁKOVÁ, K., KUNEŠ, J., KUČA, K., OPLETAL, L. (2013) Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, 8 (11), 1541-1544.
38. LEDVINA, M. (1987) Rychlé spektrofotometrické stanovení karbonylhemoglobinu v krvi. *Biochemia Clinica Bohemoslovaca*, 16, 493-495.